

10/in 9872



PCT/FR 00/01946

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

28 JUL 2000

Fait à Paris, le .....

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ  
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M+Planche', enclosed within a large, loopy oval stroke.

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30



**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **6 JUIL 1999**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9908691**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**  
DATE DE DÉPÔT **06 JUIL 1999**

1 **NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

**CABINET ORES  
6, avenue de Messine  
75008 PARIS**

2 **DEMANDE** Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☒ demande initiale

n° du pouvoir permanent. références du correspondant  
**MIPcb191/161ER**

telephone

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande  
de brevet européen

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

**Établissement du rapport de recherche**

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**PROCEDE DE PREPARATION D'UN PRODUIT LACTE IMMUNOSTIMULANT ET SES APPLICATIONS**

3 **DEMANDEUR (S)** n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

**COMPAGNIE GERVAIS DANONE**

Forme juridique

**Société Anonyme**

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

**126-130, rue Jules Guesde  
92302 LEVALLOIS-PERRET CEDEX**

Pays

**FRANCE**

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 **INVENTEUR (S)** Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 **RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES**

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 **DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE**

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 **DIVISIONS**

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 **SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

**Béatrice ORES (n° 92-4046)**



DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg.  
75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

MJPcb191/161FR

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

7908691

TITRE DE L'INVENTION :

PROCEDE DE PREPARATION D'UN PRODUIT LACTE IMMUNOSTIMULANT ET  
SES APPLICATIONS

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET ORES

6, avenue de Messine  
75008 PARIS  
FRANCE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- BLAREAU Jean-Pierre  
65, rue de Cassel, 59114 STEENVOORDE, FRANCE
- ROMOND Marie-Bénédicte  
13-14, résidence des Andély, Parc St Maur, 59800 LILLE, FRANCE
- ROMOND Charles  
21, avenue du Maréchal Leclerc, 59110 LA MADELEINE, FRANCE
- LECROIX Francis  
244, rue Henri Bailieu, 59270 GODEWAERSVELDE, FRANCE
- GONTIER Charles  
8 bis, rue Aliénor d'Aquitaine, 19360 MALEMORT-SUR-CORREZE, FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du demandeur ou du mandataire

Paris, le 6 juillet 1999

Béatrice ORES (n° 92-4046)

## PROCÉDÉ DE PRÉPARATION D'UN PRODUIT LACTÉ IMMUNOSTIMULANT ET SES APPLICATIONS

La présente invention est relative à l'utilisation de bifidobactéries pour la préparation d'aliments lactés immunostimulants convenant en particulier à l'alimentation infantile : aliments pouvant être sous forme liquide ou poudre.

Le genre *Bifidobacterium* fait partie de la famille des *Actinomycetaceae* ; il regroupe des bacilles à Gram positif, anaérobies stricts, fermentant le glucose par la voie de la fructose 6-phosphate phosphocétolase. Leur pH optimal de croissance est compris entre 6 et 7, et leur température optimale de croissance est comprise entre 37 et 40°C.

Les bifidobactéries font partie de la flore intestinale humaine normale, et on leur reconnaît de nombreux effets bénéfiques pour la santé. Il est notamment connu que les nourrissons alimentés au sein, qui possèdent une flore intestinale dans laquelle les bifidobactéries prédominent, résistent mieux aux infections et présentent notamment un risque de diarrhée plus faible que les nourrissons nourris avec des préparations lactées industrielles.

Le rôle des bifidobactéries dans cette résistance accrue aux infections n'a pas été complètement élucidé. Différentes études indiquent qu'elles possèdent un pouvoir immunostimulant qui impliquerait des substances polysaccharidique associées à la paroi bactérienne, ou sécrétées par les bactéries au cours de la fermentation anaérobie GOMEZ et al., [FEMS Microbiol. Lett., 56, 47-52, (1988), décrivent l'effet immunomodulateur de fractions exocellulaires riches en polysaccharides produites par *Bifidobacterium adolescentis* ; la Demande FR publiée sous le numéro 2652590, au nom des Laboratoires OM, décrit un exopolymère immunopotentiateur de nature

polysaccharidique produit par *Bifidobacterium infantis longum* ; HOSONO et al., [Biosci. Biotech. Biochem., 61, 312-316 (1997) et Bioscience Microflora, 17, 97-104, (1998), décrivent des polysaccharides immunopotentiateurs produits par différentes espèces de *Bifidobacterium*. L'action immunomodulatrice des bifidobactéries se manifeste également par la régulation de la microflore intestinale, en particulier au détriment du développement d'espèces bactériennes pathogènes. ROMOND et al. [Anaerobe, 3, 137-143, (1997), et J. Dairy Sci., 81, 1229-1235, (1998)] décrivent ainsi des fractions riches en glycoprotéines, produites par *Bifidobacterium breve* en conditions de fermentation anaérobie, et induisant *in vivo* un effet régulateur de la microflore intestinale.

On trouve sur le marché de nombreux produits fermentés par des bifidobactéries, éventuellement associées à d'autres bactéries lactiques, et dont l'ingestion permet de bénéficier des effets immunostimulants des bifidobactéries et de leurs produits de fermentation.

Dans le cas de l'alimentation infantile, cependant, ceux-ci ont l'inconvénient d'être trop acides et de présenter, notamment dans le cas des produits en poudre, un aspect non-homogène après reconstitution, du fait de la coagulation des protéines du lait par l'acidité générée lors de la fermentation. Ils sont donc parfois mal acceptés par l'enfant et par la mère.

Or, les Inventeurs ont maintenant découvert que la production par des bifidobactéries, de substances dotées de propriétés immunostimulantes pouvait s'effectuer sans fermentation, et donc sans acidification du produit final.

La présente Invention a pour objet un procédé de préparation d'un produit lacté immunostimulant, caractérisé en ce que l'on effectue la bioconversion d'un substrat laitier à l'aide d'une culture de

*Bifidobacterium*, par maintien dudit substrat en contact avec ladite culture, dans des conditions défavorables à la fermentation par *Bifidobacterium*.

5 On définit par « conditions défavorables à la fermentation par *Bifidobacterium* » des conditions dans lesquelles l'acidification du milieu par *Bifidobacterium* n'excède pas 0,5 unités pH en 8 heures d'incubation pour un ensemencement initial 1 à  $5 \times 10^7$  UFC par ml.

10 De telles conditions peuvent notamment être constituées par :

- le maintien en conditions aérobies, par exemple sous agitation ;
- le maintien à une pression osmotique du milieu de 0,93 à 0,97 d'activité de l'eau (AW) ;
- le maintien à une température de 40 à 48°C ;

15 ainsi que des combinaisons de ces différentes conditions.

20 La mise en contact du substrat laitier et des *Bifidobacterium* peut être effectuée à raison de  $1 \times 10^7$  à  $1 \times 10^9$  UFC par ml de substrat laitier, et la population finale de *Bifidobacterium* à l'issue de la réaction de bioconversion est de  $1 \times 10^5$  à  $1 \times 10^9$  UFC par ml de produit.

25 Le pH du substrat laitier lors de la mise en contact avec les bactéries est de préférence de 6,3 à 7 et le pH du produit à l'issue de la réaction de bioconversion est préférentiellement de 6 à 7.

30 Selon les conditions utilisées, le temps de contact entre le substrat laitier et les bactéries sera de 6 à 24 heures.

35 Le substrat laitier peut être du lait, ou tout milieu à base de lait ; il peut s'agir par exemple d'un concentré de lait, d'une base pour aliment lacté infantile, d'une base pour yoghourt, etc...

On peut ajouter au milieu à base de lait les ingrédients nécessaires à la réalisation du produit prêt à consommer que l'on souhaite obtenir. Si par exemple on souhaite obtenir un aliment lacté pour nourrissons, on  
5 ajoutera du lactose, des malto-dextrines, des minéraux, des vitamines, des matières grasses, les ingrédients permettant de reconstituer la composition du lait maternel.

---

Si on le souhaite, les matières grasses sont incorporées, puis homogénéisées avec la solution de manière à obtenir  
10 une émulsion stable.

Une souche de *Bifidobacterium breve* convenant particulièrement à la mise en œuvre de l'invention, a été déposée selon le Traité de Budapest, le 31 mai 1999, sous le numéro I-2219 auprès de la CNCM (Collection Nationale  
15 de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, à Paris.

Cette souche possède les caractéristiques suivantes :

Morphologie : bacilles courts avec rares  
20 formes en Y et V

Métabolisme : anaérobie ; production d'acides acétique et lactique L(+)

Fermentation des sucres : glucose, galactose, fructose, maltose, saccharose, lactose, esculine, ribose,  
25 mannitol, sorbitol, D raffinose, mélibiose.

La présente invention a également pour objet un produit lacté liquide caractérisé en ce qu'il peut être obtenu en mettant en œuvre un procédé conforme à l'invention.

30 Ce produit présente de préférence, à l'issue de la réaction de bioconversion, un pH de 6 à 7.

A titre de comparaison, les produits de l'art antérieur obtenus par fermentation par *Bifidobacterium* ont, en fin de fermentation un pH de 4 à 4,6.

35 Ce produit peut être consommé tel quel, ou subir différents traitements, dont la nature varie selon



le produit prêt à consommer que l'on souhaite obtenir. Il peut par exemple être additionné d'agents de texture, de saveur, de suppléments vitaminiques ou minéraux, de matières grasses, etc..., si ceux-ci n'ont pas été  
5 ajoutés dans le milieu initial. Il peut également être concentré ou dilué.

Un produit lacté conforme à l'invention peut servir de base pour la préparation d'aliments lactés  
frais.

10 Avantageusement, il peut également être utilisé pour la préparation, par stérilisation et/ou déshydratation, d'aliments de longue conservation. En effet, il conserve ses propriétés immunostimulantes même après dessiccation et stérilisation UHT.

15 La présente invention englobe également les aliments lactés frais, stérilisés, ou déshydratés obtenus à partir d'un produit lacté conforme à l'invention.

Elle englobe aussi les aliments lactés reconstitués obtenus par addition d'eau aux aliments  
20 lactés déshydratés conformes à l'invention.

Les aliments lactés (frais, stérilisés, ou reconstitués) conformes à l'invention ont généralement un pH de 6 à 7,5, de préférence de 6,5 à 6,9.

Contrairement aux aliments résultant de la  
25 fermentation par *Bifidobactérium* connus dans l'art antérieur, les aliments lactés conformes à l'invention ne sont pas acides, et contiennent les protéines du lait sous forme soluble, non-coagulée. Par addition d'eau aux aliments lactés déshydratés conformes à l'invention on  
30 peut ainsi obtenir un produit homogène, sans précipitation ou séparation de phase.

Les aliments lactés conformes à l'invention, de par leur effet immunostimulant, confèrent une protection contre les infections microbiennes et virales  
35 comparable à celle des aliments résultant de la fermentation par *Bifidobactérium* connus dans l'art

antérieur, sans présenter les inconvénients de ces derniers en termes de modification du goût et de l'aspect du produit. Ils sont particulièrement bien adaptés à l'alimentation infantile, et notamment à l'alimentation des nourrissons, mais peuvent également être utilisés pour l'alimentation de sujets de tous âges.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation de produits lactés conformes à l'invention.

**EXEMPLE 1 : FABRICATION D'UNE PRÉPARATION LACTÉE DIÉTÉTIQUE POUR NOURRISSONS, EN POUDRE, À ACTIVITÉ IMMUNOSTIMULANTE**

On prépare un concentré de lait, dont la composition, exprimée en g pour 100 g de matières sèches, est la suivante :

Protéines de lait (80% de caséine et 20% de protéines de sérum)	13
Matière grasse végétale	25,5
Lactose	42,25
Malto-Dextrines	16
Minéraux	3
Vitamines	0,25

On ajoute la matière grasse végétale à un lait de vache écrémé, chauffé à 75°C. On homogénéise à la même température en 2 étapes, la première sous 200 kgs/cm<sup>2</sup>, la seconde sous 50 kgs/cm<sup>2</sup>. On ajoute ensuite le lactose et les malto-dextrines, préalablement mis en solution dans l'eau, puis les solutions de vitamines et de minéraux.

Le mélange final est pasteurisé à 115°C, puis concentré par évaporation à 48% de matière sèche.

Le concentré refroidi à 37°C est ensuiteensemencé à raison de 5% avec une culture de *B. breve* I-2219 contenant 10<sup>9</sup> bactéries/ml. Le pH initial est de 6,15 et la pression osmotique est de 0,96.

Après incubation pendant 8 h à 37°C, dans un tank sous air avec agitation périodique 10 minutes toutes les 2 heures, le pH est de 6,1 et la population de

B. breve est de  $10^6$  bactéries/ml. L'acidité Dornic est de 48°D.

Le concentré est séché par atomisation. La poudre obtenue, additionnée à de l'eau à raison de 140 g pour un litre d'eau permet d'obtenir un lait reconstitué qui possède les caractéristiques suivantes : pH 6,6, acidité Dornic 12°D ; aspect de lait liquide sans grains de caillé.

**EXEMPLE 2 : FABRICATION D'UNE PRÉPARATION LACTÉE DIÉTÉTIQUE POUR NOURRISSONS, À ACTIVITÉ IMMUNOSTIMULANTE, PRÊTE À L'EMPLOI, STÉRILISÉE UHT ET CONDITIONNÉE ASEPTIQUEMENT**

On prépare un mélange dont la composition (en g/litre), est la suivante :

15	Protéines	21
	Matière grasse	24
	Glucides	83
	Minéraux	5
	Vitamines	0,45

20 Ce mélange est préparé à partir des ingrédients suivants (pour 100 litres de produit fini) :

- 58 litres de lait écrémé,
- 2,4 kgs de matière grasse,
- 4,7 kgs de lactose,
- 25 - 0,7 kgs de malto-dextrines,
- 0,3 kg de vitamines,
- 0,05 kg un complexe minéral.

Le lait est au préalable traité thermiquement en système UHT à une température de 115 à 120°C.

30 Dans le lait refroidi à 70°C, on incorpore la matière grasse et on procède à une homogénéisation en 2 étapes, 200 kgs/ au cours de la 1<sup>ère</sup> étape, 50 kgs à la 2<sup>ème</sup> étape.

35 Le mélange est refroidi à 37 - 38°C, puisensemencé à 1,5% avec une culture de CNCM I-2219 contenant 1 à  $5 \times 10^9$  bactéries/ml.

On incube à 37°C pendant 8 heures dans les conditions indiquées à l'exemple 1 ci-dessus, puis on procède au refroidissement, à 5°C.

Le pH du produit est de 6,3 et la population de *B. breve* est de  $3 \times 10^7$  bactéries/ml. L'acidité Dornic est de 23°D.

Le reste des ingrédients est dissout dans 50 litres d'eau d'environ puis ajouté au produit obtenu à l'issue de l'incubation.

Le mélange ainsi réalisé est soumis à un traitement UHT à 140°C pendant 6 à 7 secondes avant d'être conditionné aseptiquement.

### **EXEMPLE 3 : EFFET IMMUNOSTIMULANT DE PRODUITS LACTÉS CONFORMES À L'INVENTION**

L'effet immunostimulant des préparations lactées conformes à l'invention a été étudié comme suit :

- par l'évolution de flore fécale sur des souris à flore humaine ;
- par la régulation du phénomène de translocation sur des souris monoxéniques à *Clostridium perfringens*.

#### **Etudes de l'évolution de la flore fécale chez les souris à flore humaine :**

Les souris sont de la lignée C3H à flore humaine adule.

Il s'agit de la génération G1, la génération G0 étant des souris axéniques associées à l'âge adulte à la flore humaine.

- Nombre de souris par lot : 6
- Nombre d'essais : 2 par produit.

Les souris sont gardées 1 semaine dans une même cage puis réparties à raison de 6 par cage.

L'âge des souris au début des essais est de 8 semaines minimum à 11 semaines maximum.

- Seront suivis dans la flore fécale :
  - les Bifidobactéries

- les *Bactéroïdes Fragilis*
- les spores de *Clostridia*
- les spores de *Cl. perfringens* éventuellement

#### Techniques microbiologiques

5 L'échantillon fécal est prélevé extemporanément, pesé aseptiquement et dilué en solution préréduite de RINGER (diluée au quart et supplémentée en chlorhydrate de cystéine à 0,3 g/l).

10 Dénombrement des bifidobactéries et des bactéroïdes fragilis sur milieux préréduits de BEERENS et BBE ensemencés directement et incubés en anaérobiose.

Pour la recherche des spores de *Clostridium* :

15 - les suspensions sont chauffées 10 minutes à 75°C et ensemencées sur gélose Columbia supplémentée en glucose (5 g/l) et chlorhydrate de cystéine (0,3 g/l) et incubées 5 jours,

20 - les colonies de *Clostridium* sont repérées par leur morphologie et une réaction négative à la catalase. La morphologie cellulaire est déterminée après coloration Gram 3.

Les Résultats obtenus avec une préparation lactée témoin ayant été ensemencée avec le ferment CNCM I-2219 et administrée immédiatement sont illustrés par le Tableau I ci-dessous (temps de contact = 0)

25 Tableau I

	T 0	T 7 jours	T 15 jours
Bifidobactéries	8,2 ± 0,3	9,3 ± 0,1	8,6 ± 0,1
Bactéroïdes Fragilis	7,2 ± 0,5	9,3 ± 0,1	9,2 ± 0,1
Clostridium	4,3 ± 0,1	5,1 ± 0,5	6,7 ± 0,3

30 Les résultats sont exprimés en log. et les chiffres représentent la moyenne des résultats des 6 souris ; on constate une augmentation significative de *Bactéroïdes Fragilis* et des *Clostridia*, d'où un risque infectieux.

Les résultats obtenus avec une préparation lactée conforme à l'invention, ensemencée et ayant subi

un contact de 8 heures à 37°C avec CNCM I-2219 sont illustrés par le Tableau II ci-dessous.

Tableau II

	T O	T 7 jours	T 15 jours
Bifidobactéries	7,1 ± 0,1	11 ± 0,5	10,3 ± 0,8
Bactéroïdes Fragilis	8 ± 0,2	7,9 ± 0,3	nd < 4,7 log
Clostridium	3,9 ± 0,3	4,4 ± 0,2	4 (1 souris) 5 autres : absence
C. Perfringens	3,7 ± 0,9	nd	nd

nd : non déterminé

- 5 On constate, par rapport au témoin, une augmentation des Bifidobactéries de 2,5 log et une réduction très importante des Bactéroïdes et des *Clostridia*, notamment après 15 jours d'administration.

Études sur souris monoxéniques à *Clostridium*

10 *perfringens* :

Objectif : vérifier l'influence des produits conformes à l'invention sur la dissémination des bactéries intestinales dans différents organes.

- 15 Condition d'expérimentation : souris axéniques (âge = 8 semaines) maintenues en isolateur stérilisé, alimentées sur la base RO3 stérilisée par irradiation.

Produits testés :

- eau ultrapure stérilisée par autoclavage
  - eau ultrapure stérilisée par autoclavage
- 20 additionnée d'une préparation conforme à l'invention (PCI) à raison de 14 g (poids de poudre) pour 100 ml d'eau.

- 25 Ces solutions sont préparées stérilement chaque jour et données *ad libitum* aux souris pendant 6 jours. Au terme de cette période, *C. perfringens* souche LAB (origine humaine intestinale) est inoculé à raison de 3,5 à 4,5 log UFC par souris. On mesure l'implantation et la dissémination de *Clostridium perfringens* dans les organes lymphoïdes par sacrifice de deux souris par lot
- 30 24, 48 heures, 4 jours et 7 jours après inoculation. Les dénombrement sont effectués par la méthode du nombre le

plus probable à trois tubes en milieu LS (incubation 46°C 24-48 heures).

Les résultats sont illustrés par le Tableau III ci-après :

5

Tableau III

	J1		J2		J4		J7	
	PCI	eau	PCI	eau	PCI	eau	PCI	eau
Iléon proximal	2	2	0	1	0	2	2	2
Médian	2	0	0	1	0	2	2	2
Distal	2	0	0	1	0	2	2	2
Caecum	2	0	0	2	1	2	2	2
Colon	2	2	0	2	2	2	2	2
Plaques de Peyer	1	1	0	0	1	2	2	2
Ganglions mésentériques	0	2	0	0	1	2	1	2
Bactériémie	0	0	0	0	0	0	0	0
Rate	0	1	0	2	0	2	1	2
Foie	0	0	0	0	1	2	2	2
Rein	0	1	0	2	1	2	1	2
Poumon	0	0	0	0	0	2	0	0

Légende du Tableau III :

0 = Faible implantation/dissémination

1 = Implantation/dissémination moyenne

2 = Implantation/dissémination importante

10

On constate :

- un retard d'implantation de 24 heures de *C. perfringens* après administration du produit conforme à l'invention ;

15

- une dissémination dans les organes lymphoïdes faible, chez les souris ayant absorbé le produit conforme à l'invention (PCI).

Ces résultats montrent que les préparations conformes à l'invention régulent la dissémination de *Clostridium perfringens* dans les organes lymphoïdes.

## REVENDEICATIONS

1) Procédé de préparation d'un produit lacté immunostimulant, caractérisé en ce que l'on effectue la bioconversion d'un substrat laitier à l'aide d'une culture de *Bifidobacterium*, par maintien dudit substrat en contact avec ladite culture, dans des conditions défavorables à la fermentation par *Bifidobacterium*.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la mise en contact du substrat laitier et des *Bifidobacterium* est effectuée à raison de  $1 \times 10^7$  à  $1 \times 10^9$  UFC par ml de substrat laitier, et la population finale de *Bifidobacterium* à l'issue de la réaction de bioconversion est de  $1 \times 10^5$  à  $1 \times 10^9$  UFC par ml de produit.

3) Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le pH du substrat laitier lors de la mise en contact avec les *Bifidobacterium* est de 6,3 à 7 et le pH du produit à l'issue de la réaction de bioconversion est de 6 à 7.

4) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le temps de contact entre le substrat laitier et les bactéries est de 6 à 24 heures.

5) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'on met en œuvre une culture de *Bifidobacterium* comprenant la souche de *Bifidobacterium breve* déposée le 31 mai 1999, sous le numéro I-2219 auprès de la CNCM.

6) Produit lacté caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé selon une quelconque des revendications 1 à 5.

7) Produit lacté selon la revendication 6, caractérisé en ce que son pH est de 6 à 7.

8) Aliment lacté obtenu à partir d'un produit selon la revendication 7.



9) Aliment lacté selon la revendication 8, caractérisé en ce que son pH est de 6 à 7,5, de préférence de 6,5 à 6,9.

---



h  
p  
a

